

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 686 899**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d' nr gistement national : **92 01064**

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 P 21/02, C 12 N 15/62, 15/81, 1/19, A 61 K 37/02

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 31.01.92.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE-POULENC RORER (S.A.) —  
FR.

⑦2 Inventeur(s) : Fleer Reinhard, Fournier Alain, Guitton  
Jean-Dominique, Jung Gérard et Yeh Patrice.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 06.08.93 Bulletin 93/31.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦4 Mandataire :

⑤4 Nouveaux polypeptides biologiquement actifs, leur préparation et compositions pharmaceutiques les cont -  
nant.

⑤7 Polypeptide recombinant comportant une partie active  
dérivée d'un polypeptide ayant une activité thérapeutique,  
génétiquement couplée à une albumine ou à un variant de  
l'albumine.

FR 2 686 899 - A1



La présente invention concerne de nouveaux polypeptides biologiquement actifs, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.

5 Plus particulièrement, la présente invention concerne des polypeptides recombinants essentiellement composés d'une partie active dérivée d'un polypeptide, naturel ou artificiel, ayant une activité thérapeutique, et couplé à une albumine ou à un variant de l'albumine. Il est entendu que l'activité thérapeutique des polypeptides de l'invention  
10 peut être soit directe (traitement des maladies), ou indirecte (et par exemple utilisable dans la prévention des maladies, dans la conception des vaccins, dans les techniques de l'imagerie médicale etc...).

Il est entendu dans ce qui suit que les variants de l'albumine désignent toute protéine à haute demie-vie plasmatique obtenue par  
15 modification (mutation, délétion et/ou addition) par les techniques du génie génétique d'un gène codant pour un isomorphe donné de la sérum-albumine humaine, ainsi que toute macromolécule à haute demie-vie plasmatique obtenue par modification in vitro de la protéine codée par de tels gènes. L'albumine étant très polymorphe, de nombreux variants  
20 naturels ont été identifiés et répertoriés [Weitkamp L.R. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219].

Le but de la présente invention est d'élaborer des protéines artificielles biologiquement actives et utilisables sur le plan pharmaceutique. En effet, de nombreux polypeptides possédant une ou plusieurs  
25 activités thérapeutiques potentielles ne peuvent être exploités pharmaceutiquement. Ceci peut avoir différentes raisons, telles que notamment leur faible stabilité in vivo, leur structure complexe ou fragile, la difficulté de les produire à une échelle industriellement acceptable, etc... De même, certains polypeptides ne donnent pas les  
30 résultats attendus in vivo en raison de problèmes d'administration, de conditionnement, de pharmacocinétique etc...

La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente invention fournit en effet de nouvelles molécules permettant une exploitation optimale sur le plan thérapeutique des propriétés biologiques de ces polypeptides. La présente invention résulte  
5 notamment de la mise en évidence qu'il est possible de coupler génétiquement toute structure active dérivée d'un polypeptide biologiquement actif à une autre structure protéique constituée d'albumine, sans en altérer lesdites propriétés biologiques. Elle résulte également de la mise en évidence par la demanderesse que la sérum-  
10 albumine humaine permet de présenter efficacement la structure active à ses sites d'interaction, et qu'elle assure une stabilité plasmatique élevée du polypeptide de l'invention. Les polypeptides de l'invention permettent ainsi de maintenir dans l'organisme une activité biologique donnée pendant un temps prolongé. Ils permettent ainsi de réduire les  
15 doses administrées et, dans certains cas, de potentialiser l'effet thérapeutique, par exemple en réduisant les effets secondaires consécutifs à une administration plus importante. Les polypeptides de l'invention permettent de plus de générer et d'utiliser des structures dérivées des polypeptides biologiquement actifs très petites et donc très spécifiques  
20 d'un effet recherché. Il est entendu que les peptides ayant une activité biologique présentant un intérêt thérapeutique peuvent également correspondre à des séquences peptidiques non naturelles, isolées par exemple à partir de banques peptidiques aléatoires. Les polypeptides de l'invention possèdent par ailleurs une répartition particulièrement  
25 avantageuse dans l'organisme, ce qui modifie leurs propriétés pharmacocinétiques et favorise le développement de leur activité biologique et leur utilisation. En outre, ils présentent également l'avantage d'être faiblement ou non-immunogéniques pour l'organisme dans lequel ils sont utilisés. Finalement, les polypeptides de l'invention  
30 peuvent être exprimés (et préférentiellement sécrétés) par des organismes recombinants, à des niveaux permettant leurs exploitation industrielle.

Un objet de la présente invention concerne donc des polypeptides comportant une partie active dérivée d'un polypeptide ayant une activité thérapeutique, couplée à une albumine ou à un variant de l'albumine.

Dans un mode de réalisation particulier, les peptides possédant une activité thérapeutique ne sont pas d'origine humaine. Par exemple on peut citer des peptides, ou leurs dérivés, possédant des propriétés potentiellement utiles dans les pathologies des compartiments sanguins et interstitiels, tels que l'hirudine, la trigramine, l'antistatine, les peptides anticoagulant des tiques (TAP), l'ariétine, l'applagine etc....

Plus particulièrement, dans les molécules de l'invention, le polypeptide ayant une activité thérapeutique est un polypeptide d'origine humaine ou un variant moléculaire. Par exemple, il peut s'agir de tout ou partie, d'un enzyme, d'un inhibiteur d'enzyme, d'un antigène, d'un anticorps, d'une hormone, d'un facteur intervenant dans le contrôle de la coagulation, d'un interféron, d'une cytokine [les interleukines, mais aussi leurs variants antagonistes naturels de leur fixation au(x) récepteur(s), les cytokines de type SIS (small induced secreted) et par exemple les protéines inflammatoires des macrophages (les MIPs), etc...], d'un facteur de croissance et/ou de différenciation [et par exemple les facteurs de croissance transformants (les TGFs), les facteurs de différenciation des cellules sanguines (érythropoïétine, M-CSF, G-CSF, GM-CSF etc..), l'insuline et les facteurs de croissance qui lui ressemblent (les IGFs), ou encore les facteurs de perméabilité cellulaire (VPF/VEGF), etc...], d'un facteur impliqué dans la genèse/résorption des tissus osseux (OIF et ostéospontine par exemple), d'un facteur impliqué dans la motilité ou la migration cellulaire [et par exemple le facteur de motilité autocrine (AMF), le facteur de stimulation de la migration (MSF), ou encore le facteur de dispersion (scatter factor/facteur de croissance des hépatocytes)], d'un facteur bactéricide ou antifongique, d'un facteur chimiotactique [et par exemple le facteur plaquettaire 4 (PF4), ou encore les peptides chemoattractants des monocytes (MCP/MCAF) ou des neutrophiles (NCAF), etc...], d'un facteur cytostatique (et par exemple les protéines qui se fixent aux galactosides), d'une molécule adhésive plasmatique (et par exemple le facteur de von Willebrand, le fibrinogène etc...) ou interstitielle (laminine, ténascine, vitronectine, etc...) ou des matrices extracellulaires, ou encore toute séquence peptidique antagoniste ou agoniste d'interactions moléculaires et/ou intercellulaires impliquées

dans les pathologies des compartiments circulatoires et interstitiels et par exemple la formation des thrombus artériels et veineux, les métastases cancéreuses, l'angiogénèse tumorale, le choc inflammatoire, les maladies autoimmunes, les pathologies osseuses et ostéo-articulaires etc...

- 5           La partie active des polypeptides de l'invention peut être constituée, par exemple, par le polypeptide ayant une activité thérapeutique entier, ou par une structure dérivée de celui-ci, ou encore par un polypeptide non naturel isolé à partir d'une banque peptidique. Au sens de la présente invention, on entend par structure dérivée tout
- 10 polypeptide obtenu par modification et conservant une activité thérapeutique. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification de nature génétique et/ou chimique. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité de la molécule
- 15 pour ses sites de fixation, celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistances aux protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou encore de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. A titre d'exemple, les polypeptides chimères de l'invention possèdent des
- 20 propriétés pharmacocinétiques et une activité biologique utilisable pour la prévention ou le traitement des maladies.

Des polypeptides de l'invention particulièrement avantageux sont ceux dans lesquels la partie active présente :

- (a) la structure peptidique entière ou,
- 25           (b) une structure dérivée de (a) par modification structurale (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et possédant une activité thérapeutique.

- Parmi les structures du type (b), on peut citer plus particulièrement les molécules dans lesquelles certains sites de N- ou O-
- 30 glycosylation ont été modifiés ou supprimés, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, ou les molécules dans lesquelles tous les résidus cystéine ont été substitués. On peut citer également des molécules obtenues à partir de (a) par délétion de régions

n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés, ou exprimant une activité indésirable, et des molécules comportant par rapport à (a) des résidus supplémentaires, tels que par exemple une méthionine N-terminale et/ou un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

La partie active des molécules de l'invention peut être couplée soit directement soit par l'intermédiaire d'un peptide artificiel à l'albumine. De plus, elle peut constituer l'extrémité N-terminale comme l'extrémité C-terminale de la molécule. Préférentiellement, dans les molécules de l'invention, la partie active constitue la partie C-terminale de la chimère. Il est également entendu que la partie biologiquement active peut être redondante au sein de la chimère. Une représentation schématique des molécules de l'invention est donnée à la Figure 1.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation des molécules chimères décrites ci-avant. Plus précisément, ce procédé consiste à faire exprimer par un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide désiré, puis à récolter le polypeptide produit.

Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc... Parmi les champignons susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries telles que Escherichia coli, ou appartenant aux genres Corynebacterium, Bacillus, ou Streptomyces.

Les séquences nucléotidiques utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être préparées de différentes manières. Généralement, elles sont obtenues en assemblant en phase de lecture les séquences codant pour chacune des parties fonctionnelles du polypeptide. Celles-ci peuvent être isolées par les techniques de l'homme de l'art, et

par exemple directement à partir des ARN messagers (ARNm) cellulaires, ou par reclonage à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc), ou encore il peut s'agir de séquences nucléotidiques totalement synthétiques. Il est entendu de plus que les

5 séquences nucléotidiques peuvent également être ultérieurement modifiées, par exemple par les techniques du génie génétique, pour obtenir des dérivés ou des variants desdites séquences.

Plus préférentiellement, dans le procédé de l'invention, la séquence nucléotidique fait partie d'une cassette d'expression comprenant

10 une région d'initiation de la transcription (région promoteur) permettant, dans les cellules hôtes, l'expression de la séquence nucléotidique placée sous son contrôle et codant pour les polypeptides de l'invention. Cette région peut provenir de régions promoteurs de gènes fortement exprimés dans la cellule hôte utilisée, l'expression étant constitutive ou régulable.

15 S'agissant de levures, il peut s'agir du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK), de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), de la lactase (LAC4), des énoleses (ENO), des alcools deshydrogénases (ADH), etc... S'agissant de bactéries, il peut s'agir du promoteur des gènes droit ou gauche du bactériophage lambda (P<sub>L</sub>, P<sub>R</sub>),

20 ou encore des promoteurs des gènes des opérons tryptophane (P<sub>trp</sub>) ou lactose (P<sub>lac</sub>). En outre, cette région de contrôle peut être modifiée, par exemple par mutagénèse in vitro, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. La

25 cassette d'expression peut également comprendre une région de terminaison de la transcription fonctionnelle dans l'hôte envisagé, positionnée immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention.

Dans un mode préféré, les polypeptides de l'invention résultent

30 de l'expression dans un hôte eucaryote ou procaryote d'une séquence nucléotidique et de la sécrétion du produit d'expression de ladite séquence dans le milieu de culture. Il est en effet particulièrement avantageux de pouvoir obtenir par voie recombinante des molécules directement dans le milieu de culture. Dans ce cas, la séquence nucléotidique codant pour un

polypeptide de l'invention est précédée d'une séquence "leader" (ou séquence signal) dirigeant le polypeptide naissant dans les voies de sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence signal naturelle du polypeptide biologiquement actif dans le cas où celui-ci est une protéine naturellement sécrétée, ou celle de la structure stabilisatrice, mais il peut également s'agir de toute autre séquence "leader" fonctionnelle, ou d'une séquence "leader" artificielle. Le choix de l'une ou l'autre de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé. Des exemples de séquences signal fonctionnelles incluent celles des gènes des phéromones sexuelles ou des toxines "killer" de levures.

En plus de la cassette d'expression, un ou plusieurs marqueurs permettant de sélectionner l'hôte recombiné peuvent être additionnés, tels que par exemple le gène URA3 de la levure S. cerevisiae, ou des gènes conférant la résistance à des antibiotiques comme la généticine (G418) ou à tout autre composé toxique comme certains ions métalliques.

L'ensemble constitué par la cassette d'expression et par le marqueur de sélection peut être introduit directement dans les cellules hôtes considérées, soit inséré préalablement dans un vecteur autorépliquatif fonctionnel. Dans le premier cas, des séquences homologues à des régions présentes dans le génôme des cellules hôtes sont préférentiellement additionnées à cet ensemble; lesdites séquences étant alors positionnées de chaque côté de la cassette d'expression et du gène de sélection de façon à augmenter la fréquence d'intégration de l'ensemble dans le génôme de l'hôte en ciblant l'intégration des séquences par recombinaison homologue. Dans le cas où la cassette d'expression est insérée dans un système répliquatif, un système de réplication préféré pour les levures du genre Kluyveromyces est dérivé du plasmide pKD1 initialement isolé de K. drosophilum; un système préféré de réplication pour les levures du genre Saccharomyces est dérivé du plasmide 2 $\mu$  de S. cerevisiae. De plus, ce plasmide d'expression peut contenir tout ou partie desdits systèmes de réplication, ou peut combiner des éléments dérivés du plasmide pKD1 aussi bien que du plasmide 2 $\mu$ .



En outre, les plasmides d'expression peuvent être des vecteurs navettes entre un hôte bactérien tel que Escherichia coli et la cellule hôte choisie. Dans ce cas, une origine de réplication et un marqueur de sélection fonctionnant dans l'hôte bactérien sont requises. Il est également possible de positionner des sites de restriction entourant les séquences bactériennes et uniques sur le vecteur d'expression: ceci permet de supprimer ces séquences par coupure et religature in vitro du vecteur tronqué avant transformation des cellules hôtes, ce qui peut résulter en une augmentation du nombre de copies et en une stabilité accrue des plasmides d'expression dans lesdits hôtes. Par exemple, de tels sites de restriction peuvent correspondre aux séquences telles que 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) ou 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) dans la mesure où ces sites sont extrêmement rares et généralement absents d'un vecteur d'expression.

Après construction de tels vecteurs ou cassette d'expression, ceux-ci sont introduits dans les cellules hôtes retenues selon les techniques classiques décrites dans la littérature. A cet égard, toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule peut être utilisée. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. A titre d'exemple pour les hôtes de type levure, les différentes souches de Kluyveromyces utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. [J. Bacteriol. 153 (1983) 163]. La technique de transformation décrite par Durrens et al. [Curr. Genet. 18 (1990) 7] utilisant l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde a également été utilisée. Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, selon la méthode décrite par Karube et al. [FEBS Letters 182 (1985) 90]. Un protocole alternatif est également décrit en détail dans les exemples qui suivent.

Après sélection des cellules transformées, les cellules exprimant lesdits polypeptides sont inoculées et la récupération desdits polypeptides peut être faite, soit au cours de la croissance cellulaire pour les procédés "en continu", soit en fin de croissance pour les cultures "en lots"

("batch"). Les polypeptides qui font l'objet de la présente invention sont ensuite purifiés à partir du surnageant de culture en vue de leur caractérisation moléculaire, pharmacocinétique et biologique.

5 Un système d'expression préféré des polypeptides de l'invention consiste en l'utilisation des levures du genre Kluyveromyces comme cellule hôte, transformées par certains vecteurs dérivés du réplicon extrachromosomique pKD1 initialement isolé chez K. marxianus var. drosophilum. Ces levures, et en particulier K. lactis et K. fragilis sont généralement capables de répliquer lesdits vecteurs de façon stable et  
10 possèdent en outre l'avantage d'être incluses dans la liste des organismes G.R.A.S. ("Generally Recognized As Safe"). Des levures privilégiées sont préférentiellement des souches industrielles du genre Kluyveromyces capables de répliquer de façon stable lesdits plasmides dérivés du plasmide pKD1 et dans lesquels a été inséré un marqueur de sélection ainsi qu'une  
15 cassette d'expression permettant la sécrétion à des niveaux élevés des polypeptides de l'invention.

La présente invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides chimères décrits ci-avant, ainsi que les cellules recombinantes, eucaryotes ou procaryotes,  
20 comprenant de telles séquences.

La présente invention concerne aussi l'application à titre de médicament des polypeptides selon la présente invention. Plus particulièrement, l'invention a pour objet toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides tel que décrit  
25 ci-avant.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### LISTE DES FIGURES

Les représentations des plasmides indiquées dans les Figures suivantes ne sont pas tracées à l'échelle et seuls les sites de restriction importants pour la compréhension des clonages réalisés ont été indiqués.

5        Figure 1 :        Schématisation des chimères du type SAH-PEPTIDE (A), du type PEPTIDE-SAH (B) ou PEPTIDE-SAH-PEPTIDE (C).  
Abréviations utilisées: M/LP, résidu méthionine initiateur de la traduction, éventuellement suivie d'une séquence signal de sécrétion; SAH, albumine mature ou un de ses variants moléculaires; PEP, peptide  
10 d'origine naturelle ou artificielle possédant une propriété thérapeutique donnée. La séquence PEP peut être présente plusieurs fois dans les molécules de type A, B ou C. La flèche noire indique l'extrémité N-terminale de la protéine mature.

15        Figure 2 :        Exemples de séquences nucléotidiques d'un fragment de restriction HindIII codant pour une protéine chimère du type prépro-SA-H-PEPTIDE. Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Le site de restriction MstII est souligné et le codon spécifiant la terminaison de la traduction est en caractères gras.

20        Figure 3 :        Carte de restriction du plasmide pYG105 et stratégie générique de construction des plasmides d'expression des protéines chimères de la présente invention. Abréviations utilisées: P, promoteur transcriptionnel; T, terminateur transcriptionnel; IR, séquences répétées inversées du plasmide pKD1; LP, séquence signal de sécrétion; Ap<sup>r</sup> et Km<sup>r</sup> désignent respectivement les gènes de résistance à l'ampicilline (E. coli) et  
25 au G418 (levures).

30        Figure 4 :        Exemples de séquence nucléotidique de fragments de restriction MstII-HindIII dérivés du facteur de von Willebrand. Les sites de restriction MstII et HindIII sont soulignés et le codon de terminaison de la traduction est en caractères gras. La numérotation des acides aminés  
corresponds à la numérotation du vWF mature d'après Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. Fragments MstII-HindIII des plasmides

pYG1248 (panneau A), pYG1206 (panneau B, dans cette chimère particulière le résidu Leu694 du vWF est également le dernier résidu (Leu585) de la SAH), pYG1214 (panneau C) et pYG1223 (panneau D).

Figure 5 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1248 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-vWF Thr470-->Val713) et pKan707 (plasmide contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5%) puis traités séparément.

A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2); surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain: même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de lapin dirigés contre l'albumine humaine: surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 2) ou YPL (piste 3).

Figure 6 : Cinétique de sécrétion d'une chimère de l'invention par la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206 (SAH-vWF Leu694-Pro708).

A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 1); surnageant équivalent à 2,5 µl d'une culture "Fed Batch" en milieu YPD après 24h. (piste 2), 40h. (piste 3) ou 46h. (piste 4) de croissance.

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain: même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés (piste 1).

Figure 7 : Caractérisation du matériel sécrété par K. lactis transformé par les plasmides pKan707 (plasmide contrôle, piste 2), pYG1206 (piste 3), pYG1214 (piste 4) et pYG1223 (piste 5); standard de poids moléculaire (piste 1). Les dépôts correspondent à 50 µl de surnageant d'une culture stationnaire après croissance en milieu YPD, migration dans un gel à 8.5% d'acrylamide et coloration au bleu de coomassie.

### EXEMPLES

#### 10 TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE.

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les

spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé  
5 par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

10 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

15 La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Les transformations de K. lactis avec l'ADN des plasmides d'expression des protéines de la présente invention sont effectuées par  
20 toute technique connue de l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont E. coli MC1060 (lacIPOZYA, X74, galU, galK, strA<sup>r</sup>), ou E. coli TG1 (lac, proA,B, supE, thi, hsdD5 / F'traD36, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lacZ, M15).

25 Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre Kluyveromyces. Les souche K. lactis MW98-8C (α, uraA, arg, lys, K<sup>+</sup>, pKD1<sup>o</sup>) et K. lactis CBS 293.91 ont été particulièrement utilisées; un échantillon de la souche MW98-8C a été déposé le 16 Septembre 1988 au  
30 Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) à Baarn (Pays Bas) où il a été enregistré sous le numéro CBS 579.88.

Une souche bactérienne (E. coli) transformée avec le plasmide pET-8c52K a été déposée le 17 Avril 1990 auprès de l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC 68306.

Les souches de levures transformées par les plasmides d'expression codant pour les protéines de la présente invention sont cultivées en erlenmeyers ou en fermenteurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en milieu riche (YPD: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose; ou YPL: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% lactose) sous agitation constante.

#### EXEMPLE 1: COUPLAGE EN C-TERMINAL DE LA SAH.

Le plasmide pYG404 est décrit dans la demande de brevet EP 361 991. Ce plasmide comporte un fragment de restriction HindIII codant pour le gène de la prépro-SAH précédé des 21 nucléotides naturellement présents immédiatement en amont de l'ATG initiateur de traduction du gène PGK de S. cerevisiae. La séquence nucléotidique de ce fragment de restriction est incluse dans celle de la Figure 2. Le site MstII localisé dans la séquence codante, à trois résidus du codon spécifiant la fin de traduction est particulièrement utile comme site de clonage d'un peptide biologiquement actif que l'on désire coupler en phase traductionnelle en C-terminal de la SAH. Dans un mode de réalisation particulier, il est utile d'utiliser des peptides dont la séquence est codée par un fragment de restriction MstII-HindIII du type: 5'-CCTTAGGCTTA [3xN]<sub>p</sub> TAAGCTT-3', la séquence codant le peptide (p résidus) biologiquement actif est [3xN]<sub>p</sub>. La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (résidus Leucine-Glycine-Leucine) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Dans un autre mode de réalisation, le peptide biologiquement actif peut être présents plus d'une fois dans la chimère.

#### 30 EXEMPLE 2: COUPLAGE EN N-TERMINAL DE LA SAH.

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de mutagénèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage

traductionnel entre un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant le peptide biologiquement actif et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII et codent pour des protéines chimères du PEPTIDE-SA  
5 H (Figure 1, panneau B). Dans un mode réalisation encore plus particulier, le peptide biologiquement actif peut être présents plus d'une fois dans la chimère.

10

### EXEMPLE 3: COUPLAGE EN N- ET C-TERMINAL DE LA SAH.

Les techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR décrites dans les exemples 1 et 2 permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage  
15 traductionnel entre la forme mature de la SAH, ou un de ses variants moléculaires, et un peptide biologiquement actif couplé aux extrémités N- et C-terminales de la SAH. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII et codent pour des protéines  
20 chimères du type PEPTIDE-SA-PEPTIDE (Figure 1, panneau C), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Dans un mode réalisation encore plus particulier, le peptide biologiquement actif peut être présents plus d'une fois dans la chimère.

### 25 EXEMPLE 4: PLASMIDES D'EXPRESSION.

Les protéines chimères des exemples précédents peuvent être exprimées dans les levures à partir de promoteurs fonctionnels, régulables ou constitutifs, tels que, par exemple, ceux présents dans les plasmides pYG105 (promoteur LAC4 de Kluyveromyces lactis), pYG106  
30 (promoteur PGK de Saccharomyces cerevisiae), pYG536 (promoteur PHO5 de S. cerevisiae), ou des promoteur hybrides tels que ceux décrits dans la demande de brevet EP 361 991. Les plasmides pYG105 et pYG106 sont ici particulièrement utiles car ils permettent l'expression des gènes codés par



les fragments de restriction HindIII tel que décrits dans les exemples précédents et clonés dans le site HindIII et dans l'orientation productive (définie comme l'orientation qui place la région "prépro" de l'albumine de façon proximale par rapport au promoteur de transcription), à partir de

5 promoteurs fonctionnels chez K. lactis, régulables (pYG105) ou constitutifs (pYG106). Le plasmide pYG105 correspond au plasmide pKan707 décrit dans la demande de brevet EP 361 991 dans lequel le site de restriction HindIII unique et localisé dans le gène de résistance à la généticine (G418) a été détruit par mutagénèse dirigée tout en conservant une protéine

10 inchangée (oligodeoxynucleotide 5'-GAAATGCATAAGCTCTTGCCATTCTCACCG-3'). Le fragment SalI-SacI codant pour le gène URA3 du plasmide muté a été ensuite remplacé par un fragment de restriction SalI-SacI comportant une cassette d'expression constituée du promoteur LAC4 de K. lactis (sous la forme d'un fragment SalI-HindIII) et du terminateur

15 du gène PGK de S. cerevisiae (sous la forme d'un fragment HindIII-SacI). Le plasmide pYG105 est mitotiquement très stable chez les levures Kluyveromyces et une carte de restriction en est donnée à la Figure 3. Les plasmides pYG105 et pYG106 ne diffèrent entre eux que par la nature du promoteur de transcription encodé par le fragment SalI-HindIII.

20

#### EXEMPLE 5: TRANSFORMATION DES LEVURES.

La transformation des levures appartenant au genre Kluyveromyces, et en particulier les souches MW98-8C et CBS 293.91 de K. lactis, s'effectue par exemple par la technique de traitement des cellules

25 entières par de l'acétate de lithium [Ito H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168], adaptée comme suit. La croissance des cellules se fait à 28°C dans 50 ml de milieu YPD, avec agitation et jusqu'à une densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ) comprise entre 0,6 et 0,8; les cellules sont récoltées par centrifugation à faible vitesse, lavées dans une solution stérile de TE (10

30 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA), resuspendues dans 3-4 ml d'acétate de lithium (0,1 M dans du TE) pour obtenir une densité cellulaire d'environ  $2 \times 10^8$  cellules/ml, puis incubées à 30°C pendant 1 heure sous agitation modérée. Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension résultante de cellules compétentes sont incubés à 30°C pendant 1 heure en présence d'ADN et à

une concentration finale de 35% de polyéthylène glycol (PEG<sub>4000</sub>, Sigma). Après un choc thermique de 5 minutes à 42°C, les cellules sont lavées 2 fois, resuspendues dans 0,2 ml d'eau stérile et incubées 16 heures à 28°C dans 2 ml de milieu YPD pour permettre l'expression phénotypique du  
5 gène de résistance au G418 exprimé sous contrôle du promoteur P<sub>k1</sub> (cf. EP 361 991); 200 µl de la suspension cellulaire sont ensuite étalés sur boîtes YPD sélectives (G418, 200 µg/ml). Les boîtes sont mises à incuber à 28°C et les transformants apparaissent après 2 à 3 jours de croissance cellulaire.

#### 10 EXEMPLE 6: SECRETION DES CHIMERES.

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères. Quelques clones correspondant à la souche CBS 293.91 ou MW98-8C transformée par les plasmides d'expression des  
15 chimères entre la SAH et la partie biologiquement active sont mis à incuber en milieu YPD ou YPL à 28°C. Les surnageants cellulaires sont récupérés par centrifugation quand les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance, éventuellement concentrés 10 fois par précipitation pendant 30 minutes à -20°C dans une concentration finale de  
20 60% d'éthanol, puis testés après électrophorèse en gel SDS-PAGE à 8.5%, soit directement par coloration du gel par du bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant des anticorps primaires dirigés contre la partie biologiquement active ou un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la SAH. Lors des expériences de détection immunologique, le filtre de  
25 nitrocellulose est d'abord incubé en présence des anticorps primaires spécifiques, lavé plusieurs fois, incubé en présence d'anticorps de chèvre dirigés contre les anticorps primaires, puis incubé en présence d'un complexe avidine-péroxydase en utilisant le "kit ABC" distribué par Vectastain (Biosys S.A., Compiègne, France). La réaction immunologique  
30 est ensuite révélée par addition de diamino-3,3' benzidine tetrachlorhydrate (Prolabo) en présence d'eau oxygénée, selon les recommandations du fabricant.

## EXEMPLE 7: CHIMERES DERIVEES DU FACTEUR DE VON WILLEBRAND.

### E.7.1. Fragments antagonistes de la fixation du vWF aux plaquettes.

#### E.7.1.1. Résidus Thr470-Val713 du vWF.

- 5 Le plasmide pET-8c52K comporte un fragment du cDNA du vWF codant pour les résidus 445 à 733 du vWF humain et inclus donc plusieurs déterminants cruciaux de l'interaction entre le vWF et les plaquettes d'une part, et certains éléments de la membrane basale et du tissu sous-endothelial d'autre part, et notamment les peptides G10 et D5
- 10 antagonistes de l'interaction entre vWF et GP1b [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. Cette séquence peptidique est identique à la séquence correspondante décrite par Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184] à l'exception du résidu 618 (thréonine à la place de l'alanine). L'amplification de ces déterminants génétiques peut être réalisée à partir
- 15 du plasmide pET-8c52K, par exemple par la technique d'amplification PCR, en utilisant comme amorce des oligodéoxynucléotides codant pour des résidus contigus localisés de part et d'autres de la séquence à amplifier. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés dans des vecteurs du type M13 en vue de leur vérification par séquençage en utilisant soit les
- 20 amorces universelles situées de part et d'autre du multisite de clonage, soit des oligodéoxynucléotides spécifiques de la région amplifiée du gène du vWF dont la séquence de plusieurs isomorphes est connue [Sadler J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-
- 25 3171; Bonthron D. et al., Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127]. Ainsi, l'amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCTGTGAAGCCTGC-3' (Sq1969, le site MstII est souligné) et 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGACTTGTGCCATGTCTG-3' (Sq2029, le site HindIII est souligné) génère un
- 30 fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF (Figure 4, panneau A). La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII

comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1248.

#### E.7.1.2. Variants moléculaires.

Dans un autre mode de réalisation, le site de liaison du vWF est un peptide incluant les résidus Thr470 à Asp498 du vWF mature. Cette séquence inclus le peptide G10 (Cys474-Pro488) décrit par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904] et capable d'antagoniser l'interaction du vWF humain à la GP1b des plaquettes humaines. La séquence correspondant au peptide G10 est d'abord incluse dans un fragment de restriction MstII-HindIII (Figure 4, panneau B), par exemple par amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGTCCTCCACATACAG-3' (Sq1970, le site HindIII est souligné), ce qui génère un fragment de restriction MstII-HindIII incluant le peptide G10, et dont la séquence est: 5'-CCTTAGGCTTAACCTGTGAAGCCTGCCAGGAGCCGGGAGGCCTGGTGGTGCCTCCACAGATGCCCCGGTGAGCCCCACCACTCTGTATGTG-GAGGACTAAGCTT-3'(la séquence codant pour le peptide G10 est en caractères gras). La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1214.

Dans un autre mode de réalisation, le site de liaison du vWF à la GP1b est directement conçu à l'aide d'oligodéoxynucléotides synthétiques, et par exemple les oligodéoxynucléotides 5'-TTAGGCCTCTGTGACCTTGCCCCTGAAGCCCCTCCTCCTACTCTGCCCCCTAAGCTTA-3' et 5'-GATCTAAGCTTAGGGGGGCAGAGTAGGAGGAGGGGCTTCAGGGGCAAG-

GTCACAGAGGCC-3'. Ces oligodéoxynucléotides forment en s'appariant un fragment de restriction MstII-BglII incluant le fragment MstII-HindIII (Figure 4, panneau C) correspondant au peptide D5 défini par les résidus Leu694 à Pro708 du vWF. La ligature du fragment MstII-HindIII avec le  
5 fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la  
10 région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1206.

Des variants utiles du plasmide pET-8c52K sont délétés par mutagenèse dirigée entre les peptides G10 et D5, par exemple des sites de  
15 fixation au collagène, et/ou à l'héparine, et/ou à la botrocétine, et/ou aux sulfatides et/ou à la ristocétine. Un exemple est le plasmide pMMB9 délétés par mutagenèse dirigée entre les résidus Cys509 et Ile662. L'amplification PCR de ce plasmide avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et Sq2029 génère un fragment de restriction MstII-HindIII (Figure 4,  
20 panneau D) incluant les résidus Thr470 à Tyr508 et Arg663 à Val713 et en particulier les peptides G10 et D5 du vWF et délété en particulier de son site de fixation au collagène localisé entre les résidus Glu542 et Met622 [Roth G.J. et al. Biochemistry 25 (1986) 8357-8361]. La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la  
25 totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction  
30 est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1223.

Dans d'autres modes de réalisation, l'utilisation des techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR permet de générer à volonté des variants du fragment de restriction MstII-HindIII du

panneau A de la Figure 4 mais délétés d'un ou plusieurs sites de fixation aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène et/ou tout résidu impliqué par mutation naturelle dans l'émergence de pathologies de type IIB associée au vWF.

5 Dans d'autres variants utiles du plasmide pET-8c52K des mutations sont introduites, par exemple par mutagénèse dirigée, pour remplacer ou supprimer tout ou partie de l'ensemble des cystéines présentes aux positions 471, 474, 509 et 695 du vWF humain. Des exemples particuliers sont les plasmides dans lesquels les cystéines présentes aux positions 471  
10 et 474 d'une part et aux positions 471, 474, 509 et 695 d'autre part ont été respectivement remplacés par des résidus Glycine. L'amplification PCR de ces plasmides avec les oligodéoxynucléotides Sq2149 (5'-CCCGGGA-TCCCTTAGGCTTAACCGGTGAAGCCGGC-3', le site MstII est souligné) et Sq2029 permet de générer des fragments de restriction MstII-HindIII  
15 incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF naturel à l'exception qu'au moins les résidus Cystéine aux positions 471 et 474 ont été mutés en des résidus Glycine. La ligature de ces fragments avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure  
20 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ces fragments de restriction sont clonés dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui  
25 génère les plasmides d'expression correspondants.

D'autres mutations particulièrement utiles concernent au moins un résidu impliqué dans des pathologies de type IIB associées au vWF, comme les résidus Arg543, Arg545, Trp550, Val553 ou Arg578 par exemple.

### 30 E.7.2. Fragments antagonistes de la fixation du vWF au sous endothélium.

Dans un mode de réalisation particulier, les sites de liaison du vWF aux composants du tissu sous-endothélial, et par exemple du collagène, sont générés par amplification PCR du plasmide pET-8c52K, par exemple

avec les oligodéoxynucléotides Sq2258 (5'-GGATCCTTAGGGCTG-TGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTC-3', le site MstII est souligné) et Sq2259 (5'-GAATTCAAGCTTAACAGAGGTAGCTAACGATCTCGTCCC-3', le site HindIII est souligné), ce qui génère un fragment de restriction

5 MstII-HindIII codant pour les résidus Cys509 à Cys695 du vWF naturel. Des variants moléculaires de délétion ou modifiés sont également générés qui comportent toute combinaison souhaitable entre les sites de fixation du vWF aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène et/ou tout résidu responsable d'une augmentation de

10 l'affinité du vWF pour la GP1b (pathologies de type IIB associée au vWF). Dans un autre mode de réalisation, le domaine capable de se fixer au collagène peut également provenir du fragment du vWF compris entre les résidus 911 et 1114 et décrit par Pareti et al. [J. Biol. Chem. (1987) 262: 13835-13841]. La ligature de ces fragments avec le fragment de restriction

15 HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère des fragments de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation

20 "prépro" de la SAH. Ces fragments de restriction sont clonés dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère les plasmides d'expression correspondants.

#### 25 EXEMPLE 8: PURIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DES CHIMERES ENTRE SAH ET vWF.

Les chimères présentes dans les surnageants de culture correspondant à la souche CBS 293.91 transformée, par exemple par les plasmides pYG1248, pYG1214, pYG1206, ou pYG1223, sont purifiées et caractérisées. Les surnageants sont concentrés, par exemple par

30 précipitation en présence d'éthanol, et le culot est resolubilisé dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0. les chimères sont alors purifiées par chromatographie d'affinité, par exemple sur Bleu-Trisacryl (IBF). Une purification supplémentaire par chromatographie d'échange d'ions peut être effectuée si nécessaire. Après élution, les fractions contenant la

protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation physicochimique et immunologique. Les résultats des Figures 5 à 7 démontrent que la levure K. lactis est capable de sécréter des protéines chimères entre la SAH et un fragment du vWF, et que ces

5 chimères sont correctement reconnues par des anticorps reconnaissant la SAH ou le vWF. De plus, le séquençage (Applied Biosystem) des chimères purifiées indique la séquence N-terminale attendue de l'albumine mature (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de ladite protéine chimère immédiatement en C-terminal du doublet de

10 résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (cf. Figure 2).



## REVENDECATIONS

1. Polypeptide recombinant comportant une partie active dérivée d'un polypeptide ayant une activité thérapeutique, génétiquement couplée à une albumine ou à un variant de l'albumine.
- 5        2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est un polypeptide d'origine humaine.
- 10       3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est choisi parmi tout ou partie des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des antigènes, des anticorps, des hormones, des facteurs de la coagulation, des interférons, des cytokines, des facteurs de croissance et/ou de différenciation, des facteurs impliqués dans la génèse/résorption des tissus osseux, des facteurs chimiotactiques, des facteurs de motilité ou de migration  
15       cellulaire, des facteurs cytostatiques, des facteurs bactéricides ou antifongiques, ou des molécules adhésives plasmatiques, interstitielles ou des matrices extracellulaires.
- 20       4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est choisi parmi toute séquence peptidique antagoniste ou agoniste d'interactions moléculaires et/ou cellulaires impliquées dans les pathologies des compartiments circulatoires et interstitiels.
- 25       5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la partie active présente une structure choisie parmi :
  - (a) la structure peptidique entière ou,
  - (b) un fragment de (a) ou une structure dérivée de (a) par modification structurale (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et conservant une activité thérapeutique.

6. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité N-terminale de l'albumine.
- 5 7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité C-terminale de l'albumine.
8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la partie active y est représenté plusieurs fois.
9. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.
- 10 10. Séquence nucléotidique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence "leader" permettant la sécrétion du polypeptide exprimé.
11. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 9 ou 10 sous le contrôle d'une région d'initiation de la transcription et éventuellement d'une région de terminaison de la transcription.
- 15 12. Plasmide autorépliquatif comportant une cassette d'expression selon la revendication 11.
13. Cellule recombinante eucaryote ou procaryote dans laquelle a été inséré une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 9 ou 10 ou une cassette d'expression selon la revendication 11 ou un plasmide selon la revendication 12.
- 20 14. Cellule recombinante selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure, d'une cellule animale, d'un champignon ou d'une bactérie.
- 25 15. Cellule recombinante selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

16. Cellule recombinante selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Saccharomyces ou Kluyveromyces.

17. Procédé de préparation d'un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule  
5 recombinante selon l'une des revendications 13 à 16 dans des conditions d'expression, et on récupère le polypeptide produit.

18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

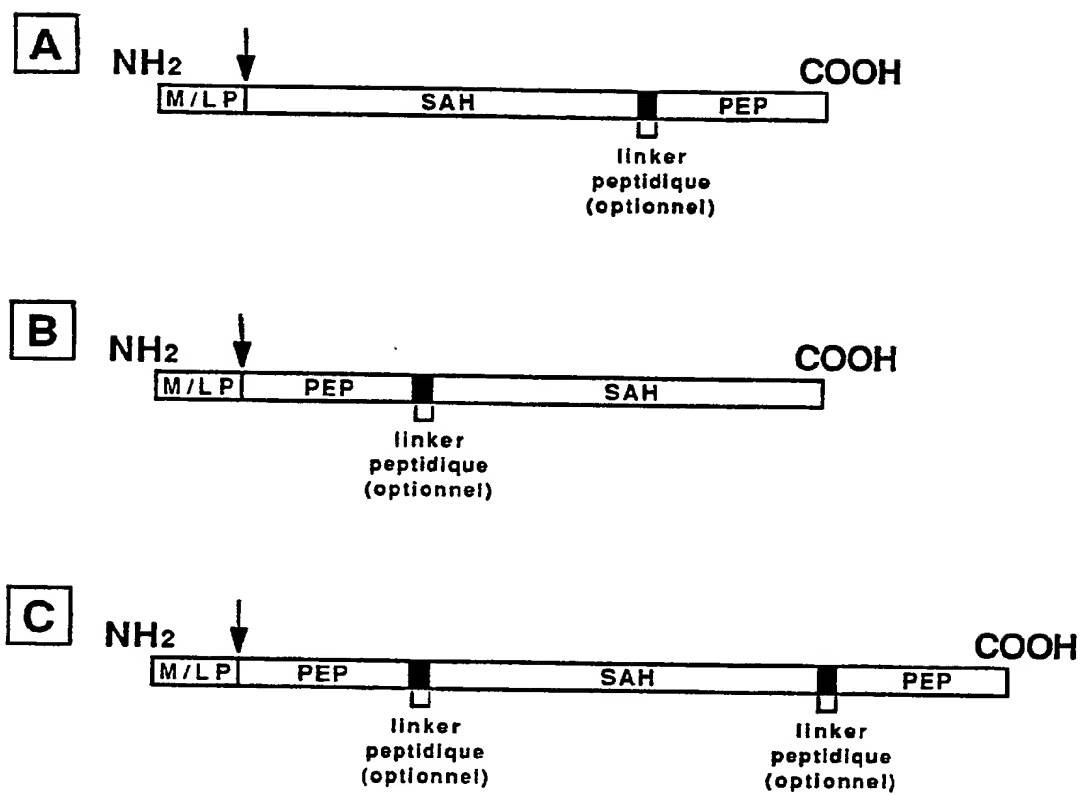


FIGURE 1

AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA	ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT	-12
	Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe	
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT	Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His	9
CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG	Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln	29
TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT	Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe	49
GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT	Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu	69
TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC	Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp	89
TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC	Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn	109
CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC	Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp	129
AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT	Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe	149
TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC	Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys	169
CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG	Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly	189
AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA	Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg	209
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA	Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala	229
GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT	Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp	249
CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT	Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp	269
TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC	Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys	289
ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT	Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe	309
GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG	Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met	329
TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT	Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu	349
GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC	Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys	369
TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA	Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys	389
CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT	Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val	409
CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC	Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn	429

FIGURE 2 (a)

PL. III/8

CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA	
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala	449
GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA	
Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val	469
AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA	
Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser	489
GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC	
Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe	509
CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT	
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu	529
GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT	
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp	549
GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC	
Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala	569
GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT <u>GCC TTA GGC</u> TTA (NNN)p TAA GCTT	
Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu (X)p ***	

FIGURE 2 (b)

PL. IV/8

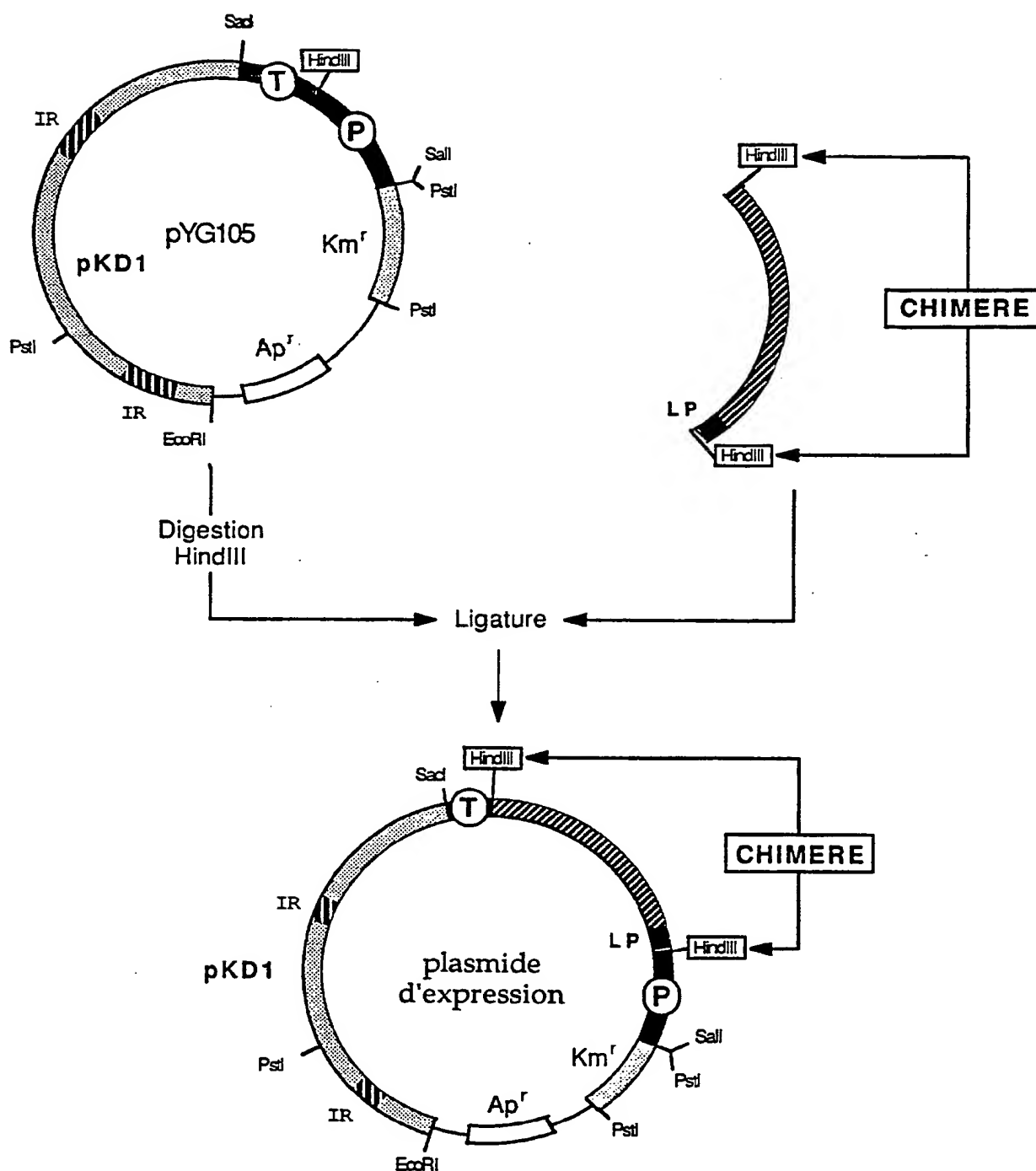


FIGURE 3

PL. V/8

A

CC TTA GGC TTA (NNN) 244 TAA GCTT  
 Leu Gly Leu (Thr470->Val713) \*\*\*

B

CC TTA GGC TTA (NNN) 29 TAA GCTT  
 Leu Gly Leu (Thr470->Asp498) \*\*\*

C

CC TTA GGC CTC (NNN) 14 TAA GCTT  
 Leu Gly Leu (Cys695->Pro708) \*\*\*  
 <----- D5 ----->

D

CC TTA GGC TTA (NNN) 90 TAA GCTT  
 Leu Gly Leu (Thr470->Tyr508, Arg663->Val713) \*\*\*

FIGURE 4



PL. VI/8

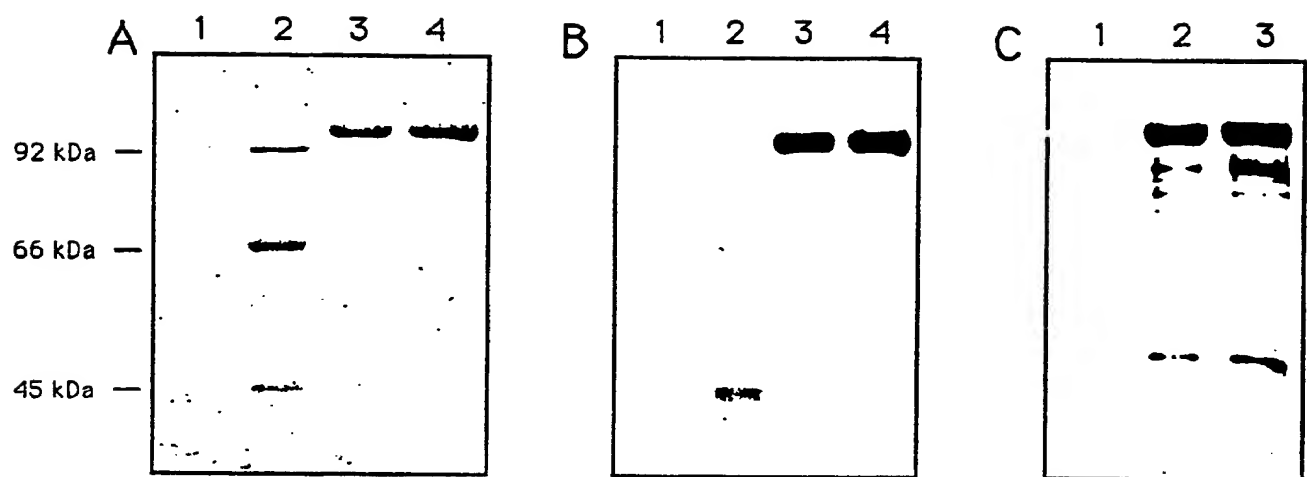


FIGURE 5

PL. VII/8

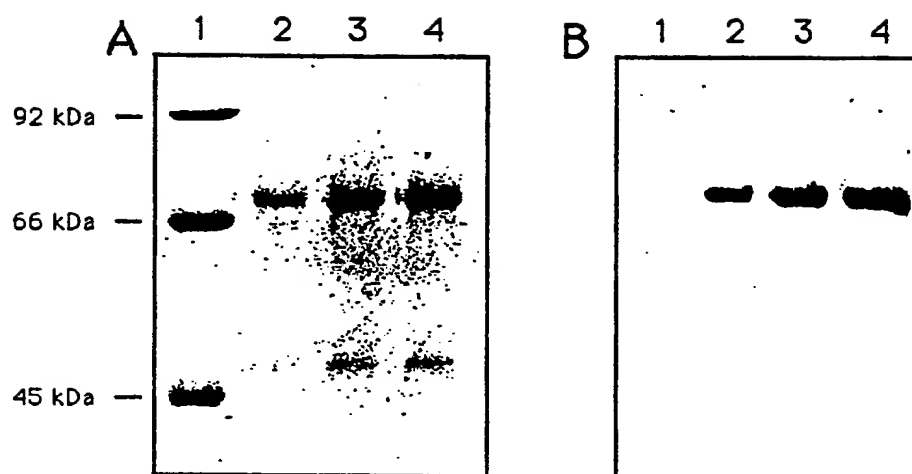


FIGURE 6

PL. VIII/8

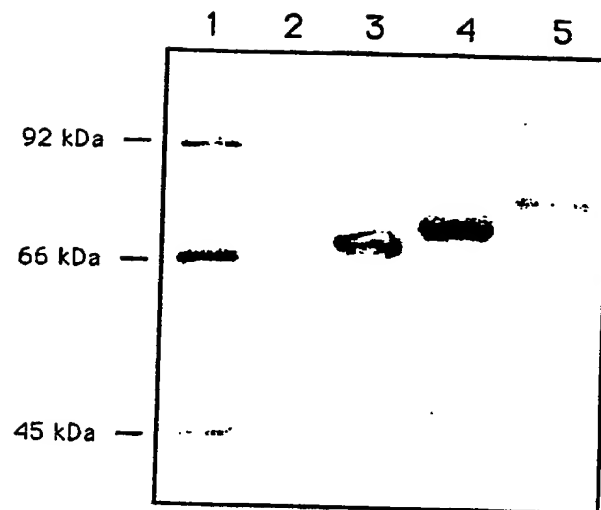


FIGURE 7

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9201064  
FA 467121

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-9 013 653 (DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED) 15 Novembre 1990 * page 11, alinéa 3 - page 12, alinéa 2; revendications 1-7 *	1-5, 7, 9-18
X	WO-A-8 902 922 (GENENTECH, INC.) 6 Avril 1989  *revendications 1, 2, 5, 8, 12, 17, 24, 25, 41, 44*	1-2, 5, 6, 9, 10, 17-18
X	EP-A-0 413 622 (RHONE-POULENC SANTE) 20 Février 1991 * revendications 1-29 *	1, 2, 5, 7-18
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 15, no. 472 (C-889)(5000) 29 Novembre 1991 & JP-A-3 201 987 ( TONEN CORP. ) 3 Septembre 1991 * abrégé * & WORLD PATENTS INDEX LATEST Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 91-300976 * abrégé *	1, 9, 12, 13, 17
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (int. Cl.5)
		C07K C12N
Date d'achèvement de la recherche 20 AOUT 1992		Examinateur THIELE U.H. -C.H.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant		